

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 14 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590798

研究課題名（和文） ラット胃伸展刺激に伴う内臓痛と TRPA1 チャネル活性化との関連

研究課題名（英文） Transient receptor potential A1 mediates gastric distention-induced visceral pain in rats

研究代表者

田中 淳二（TANAKA JUNJI）

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：90412022

研究成果の概要（和文）：

TRPA1 の発現の多くは胃への投射繊維を有する DRG 及び NG ニューロンで発現しており、さらに TrkA、SP、CGRP 及び TRPV1 と共存していた。一方、胃においては SP、CGRP 陽性神経終末に発現していた。TRPA1 アンチセンスを臓腔内に投与すると、胃伸展刺激後の疼痛動作が有意に抑制され、同時に DRG における ERK の活性化が抑制された。最後に、TRPA1 のアンタゴニストである NC-030031 を髄腔内投与あるいは腹腔内投与すると、伸展刺激に伴う疼痛関連動作が抑制されることがわかった。以上の結果より、急性内臓痛の発現における TRPA1 が重要な役割を果たしている可能性を示唆することができた。

研究成果の概要（英文）：

TRPA1 was predominantly expressed with sensory neuropeptides in dorsal root ganglion (DRG) and nodose ganglion (NG) neurons, and in nerve fibers in the rat stomach. Intrathecal injection of TRPA1 antisense attenuated the visceromotor response, and suppressed ERK1/2 activation in the DRG, but not NG, neurons produced by gastric distention (GD). Furthermore, intrathecal and intraperitoneal injections of the TRPA1 inhibitor HC-03003 suppressed the response to noxious GD. The activation of TRPA1 in DRG neurons by noxious GD may be involved in acute visceral pain.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：上部消化管学（食道、胃、十二指腸）、内臓痛

1. 研究開始当初の背景

機能的胃腸症（functional dyspepsia；FD）は消化管に器質的疾患を認めないものの、胃痛、腹部不快感、腹部膨満感、食後早期の満腹感、食欲低下、嘔気、嘔吐、胸焼けなどの上部消化器症状が持続的・断続的に認められ

る疾患である。FDの発症には胃排泄遅延、胃受容弛緩反応の異常、胃酸分泌異常、消化管知覚過敏や心理的要因などが複雑に関与するものと考えられている。FDの臨床症状はさまざまであるものの、胃受容弛緩の不全に基づく膨満感や知覚過敏など、それらの多くは知

覚神経系の異常に起因することが考えられる。胃の知覚は一般的に脊髄神経系を介する経路と、迷走神経系を介する経路とが考えられているが、この2つの異なる経路の働きの違いなど、内臓知覚神経系の研究は体性感覚系のそれと比較して非常に少なく、未だその詳細については明らかではない。

カプサイシンレセプターであるtransient receptor potential ion channel TRPV1は外部からの熱刺激を神経系の電氣的興奮に変えるトランスダクション(転換)にかかわる初の分子として見出された。大腸での報告では、TRPV1ノックアウトマウスの解析より、TRPV1は機械的刺激に対する侵害受容にも関与していることが分かっている。実際に、全消化管の粘膜固有層にTRPV1陽性神経線維が確認されており、また興味深いことに、ラットの胃内に塩酸を投与すると、脊髄後根神経節(DRG)においてTRPV1の発現が著明に増加する。一方、TRPA1はTRPV1と同様、感覚神経のみに発現し、様々な炎症性メディエーターによって活性化されることが報告されている。我々は、炎症性疼痛過敏の発症メカニズムにおけるTRPA1の役割の解明に研究を積み重ねてきた。しかし、胸髄レベル(Th9、10)でのDRG、および迷走神経節(NG)におけるTRPA1の発現の有無、さらにはこの受容体と胃伸展刺激に伴う急性内臓痛との関連は現在までのところ全く不明であった。

2. 研究の目的

(1)DRG、NG、及び胃粘膜固有層におけるTRPA1の局在

ラット後根神経節(DRG)由来のcDNAからTRPA1のRNA probeを作製する。Northern blot analysis、*In situ* hybridization (ISHH)法、及び定量的RT-PCR法を用いて、侵害受容ニューロンでのTRPA1イオンチャンネルの発現を調べる。さらにTRPA1(精製済み)蛋白に対するpolyclonal抗体を用いた免疫組織化学、及びWestern blottingを施行する。二重染色、連続切片に対するISHH法、さらにはdigoxigenin-labeled probeを用いた二重ISHHによって、DRG、NGニューロンのサブタイプを特定し、TRPファミリーの分布の違いを明らかにする。サブタイプのマーカーとしては、有髄線維を染めるNF200の他、比較的広く用いられているIB4、TrkA、TrkB、TrkC、SP、CGRP、P2X3を用いる。さらに、TRPファミリー同士の共存を直接調べることで、温度受容体の組み合わせを突き止める。

(2)リン酸化ERK1/2を活性化マーカーとしたTRPA1の機能解析

SD雄性ラットを使用。あらかじめ胃内にバルーンを留置し、5日後、浅麻酔下でバルーン内に内圧をモニタリングしながら液体を注入し、各内圧(0、20、40、60、80、100 mmHg)

によって誘発される僧帽筋の筋電図を測定する。各内圧(0、40、60、80、100mmHg)で胃への伸展刺激を加えた2分後に、Th9、10のDRG、およびNGを摘出し、ERK1/2活性化の指標であるリン酸化ERK1/2(p-ERK1/2)に対するpolyclonal抗体を用いた免疫組織化学、およびWestern blottingを施行し、定量化を行う。

(3)TRPA1アンチセンスオリゴヌクレオチドの疼痛関連動作に及ぼす影響

TRPチャンネル温度受容体に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド(TRPA1)を購入し、osmoticポンプを用いて持続的に髄腔内投与する。手術後5日目に、100mmHgで胃への伸展刺激を加え、誘発される僧帽筋の筋電図を測定する。伸展刺激によって疼痛関連動作(僧帽筋における筋電図の変化)が生じるかどうかを検討する。さらにDRGやNGにおいてTRPA1がknock downされているかどうかを、免疫組織化学、およびWestern blottingを用いて確認する。

3. 研究の方法

(1)まず、一次知覚ニューロンの存在するTh9、10のDRGやNGを含めた末梢神経系、さらには胃粘膜固有層自体におけるTRPA1の発現・分布を、免疫組織化学法、Western blotting法、*in situ* hybridization法、RT-PCR法を組み合わせで詳細に調べる。

(2)MAP kinaseの一員であるExtracellular signal-Regulated Kinase 1/2 (ERK1/2)は、細胞内情報伝達に関与し、その活性化が脊髄後根神経節(DRG)や脊髄後角などで認められ、痛みの発生やそれに伴う変化に重要であるとされる。最近、我々はラットの胃に侵害性の伸展刺激を加えたとき、DRGにおいてシグナル伝達分子の一員であるERK1/2がリン酸化して末梢神経系の感作に関与していることを発見した。SDラットを用い、あらかじめ胃内に留置したバルーン内に内圧をモニタリングしながら液体を注入する。様々な内圧で伸展刺激を2分間加えた後、Th9、10のDRG、NG、及び胃粘膜を摘出し、リン酸化ERK1/2に対する抗体を用いて、免疫染色を行う。ERK1/2の活性化がTRPA1を含有しているニューロンで生じているのかを組織学的に同定する。

(3)TRPA1アンチセンスオリゴヌクレオチドを髄腔内投与することで、TRPA1 knock downラットを作製し、胃に伸展刺激を加えた後の疼痛関連動作(僧帽筋の筋電図)の変化と、DRG、NG、及び胃粘膜固有層においてERK1/2の活性化が生じるかどうかを明らかにする。

4. 研究成果

(1)TRPA1の発現の多くは胃への投射繊維を有するDRG及びNGニューロンで発現しており、さらにTrkA、SP、CGRP及びTRPV1と共存してい

た。一方、胃においてはSP、CGRP陽性神経終末に発現していた。TRPA1アンチセンスを臓腔内に投与すると、胃伸展刺激後の疼痛動作が有意に抑制され、同時にDRGにおけるERKの活性化が抑制された。また、この胃伸展刺激に伴うERKの活性化はTRPA1を含有しているニューロンで生じていることを二重染色にて確認した。最後に、TRPA1のアンタゴニストであるNC-030031を髄腔内投与あるいは腹腔内投与すると、伸展刺激に伴う疼痛関連動作が抑制されることがわかった。以上の結果は、Gutに発表した。

以上の結果より、急性内臓痛の発現におけるTRPA1が重要な役割を果たしている可能性を示唆することができた。今後、病態モデルを用いた実験を通し、TRPA1の疼痛過敏発症メカニズムにおける関与を解明することで、TRPA1が機能性胃腸症治療における新薬開発のシーズとなる可能性がある。臨床における機能性胃腸症の診断及び治療はいまだ確立されていないが、患者数は年々増加の一途をたどっている。今後、病態モデルを用いた実験を通し、TRPA1の疼痛過敏発症メカニズムにおける関与を解明することで、TRPA1が機能性胃腸症治療における新薬開発のシーズとなる可能性がある。

引き続き、さらなる病態モデルを用いた実験を通し、TRPA1の疼痛過敏発症メカニズムにおける関与を解明することで、TRPA1が機能性胃腸症治療における新薬開発のシーズとなる可能性がある。この内臓痛メカニズムの解明という課題の発展のため、新規内臓痛モデルの開発として、下部消化管（直腸）の伸展刺激モデルの作成を開始した。

(2)直腸を用いた内臓痛モデルの作成

内臓痛の研究では世界の先端を進んでいる米国 Gebhart のグループの論文を参考にして、ラット直腸内へのバルーン挿入、伸展による内臓痛モデルを作成した。疼痛行動は、ラット僧帽筋の筋電図測定にて定量化を行い、ほぼ安定的に行えるようになった。直腸内の伸展圧と筋電図の定量化できる波形に、正の相関関係が得られるようになった。本モデルを用いて TRPA1 チャンネル活性を抑えるために、アンチセンスオリゴやチャンネル阻害剤を投与した際にどのような変化があるかを検討中である。

(3)同時に、上記で Gut に報告した胃伸展刺激モデルにおける p38 の活性化と内臓痛の関係についてのデータも検討中である。胃伸展により DRG において p38 の活性化は確認出来ており、それが TRPA1 チャンネルを通じたものかどうか、現在検討中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計4件)

- ①. Fukuoka T, Yamanaka H, Kobayashi K, Okubo M, Miyoshi K, Dai Y, Noguchi K. (2012) Re-evaluation of the phenotypic changes in L4 dorsal root ganglion neurons after L5 spinal nerve ligation. *Pain*, 153:68-79. 査読有
DOI: 10.1016/j.pain.2011.09.009
- ②. Gu M, Miyoshi K, Dubner R, Guo W, Zou S, Ren K, Noguchi K, Wei F., (2011) Spinal 5-HT(3) receptor activation induces behavioral hypersensitivity via a neuronal-glia-neuronal signaling cascade. *J. Neurosci.*, 31, 12823-12836. 査読有
DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1564-11.2011
- ③. Narita M, Niikura K, Nanjo-Niikura K, Narita M, Furuya M, Yamashita A, Saeki M, Matsushima Y, Imai S, Shimizu T, Asato M, Kuzumaki N, Okutsu D, Miyoshi K, Suzuki M, Tsukiyama Y, Konno M, Yomiya K, Matoba M, Suzuki T. (2011) Sleep disturbances in a neuropathic pain-like condition in the mouse are associated with altered GABAergic transmission in the cingulate cortex. *Pain*, 152, 1358-1372. 査読有
DOI: 10.1016/j.pain.2011.02.016
- ④. Toyoshima F, Oshima T, Nakajima S, Sakurai J, Tanaka J, Tomita T, Hori K, Matsumoto T, Miwa H. Serotonin transporter gene polymorphism may be associated with functional dyspepsia in a Japanese population. *BMC Med Genet* 2011;12:88 査読有
DOI: 10.1186/1471-2350-12-88

〔学会発表〕(計2件)

- ①. Kondo T, Oshima T, Yamasaki T, Okugawa T, Asano H, Toyoshima F, Sakurai J, Tanaka J, Tomita T, Fukui H, Hori K, Watari J, Matsumoto T, Noguchi K, Miwa H. Activation of p38 MAPK through transient receptor potential A1 mediates gastric distention-induced visceral pain in rats. 19th United European Gastroenterology Week (UEGW2011) 2011.10.22 Stockholm
- ②. Miyoshi K, Noguchi K. Critical role for spinal IL-18/caspase-1 interaction in neuropathic pain development through its distinct regulation of interleukins. World Congress on PAIN. Montreal, Canada, 2010.8.30

〔図書〕(計2件)

- ① 田中淳二, 三輪洋人. 第6章 6 胃癌.
消化器内科学 シュプリンガー-ジャパ
ン; 138-46, 2010
- ② 田中淳二. 第VII章 消化器系の症状・
徴候と疾患 3.消化関係の症状・徴候
G.胃・十二指腸潰瘍. 疾病と治療II 南
江堂; 46-51, 2010

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 淳二 (TANAKA JUNJI)
兵庫医科大学・医学部・助教
研究者番号: 90412022

(2) 研究分担者

三好 勲 (MIYOSHI KAN)
兵庫医科大学・医学部・助教
研究者番号: 30454755

(3) 連携研究者

なし